

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**



# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**František Pešina**

**Role signalizace poškození DNA v navození a udržení buněčné  
senescence**

**Role of DNA damage response signalling in promotion and  
maintenance of cellular senescence**

**školitel: MUDr. Zdeněk Hodný, Csc.**

**Praha 2012**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně a uvedl všechny prameny a použitou literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 11. 5. 2012

František Pešina

**Poděkování:**

Rád bych zde poděkoval svému školiteli za uvedení do tématu a cenné připomínky. Velký dík patří i mé rodině a přítelkyni za podporu a trpělivost.

## Obsah:

1. Úvod.....	6
2.Charakteristiky senescentních buněk .....	7
3. Rozdělení senescencí podle příčiny .....	8
3.1 Telomery dependentní senescence.....	8
3.2 Senescence indukovaná poškozením DNA.....	10
3.3 Onkogeny indukovaná senescence.....	10
3.4 Senescence vyvolaná poruchami chromatinu.....	11
3.5 Senescence navozená jinými faktory .....	12
4. Hlavní signální dráhy senescence .....	12
4.1 Dráha p53/p21 .....	12
4.1.1 Aktivace dráhy p53/p21 .....	13
4.1.1.1 ARF .....	13
4.1.1.2 Odpověď na poškození DNA.....	13
4.1.2 p21 jako transkripční cíl a efektor p53.....	14
4.2 Dráha p16/RB .....	15
4.2.1 Role p16.....	15
4.2.2 Aktivace .....	15
4.2.3 Realizace .....	16
4.3 Dráha Wnt2/GSK3 $\beta$ /HIRA .....	16
5. Porovnání funkce drah p16/RB a p53 .....	18
6. Závěr.....	19
7. Použitá literatura.....	20

## **Abstrakt**

Buněčná senescence je stav trvalé zástavy buněčného cyklu. Je indukována mnoha stimuly zahrnujícími zkracování telomer, poškození DNA, onkogenní hyperstimulaci, poruchy chromatinu, či různé stresy působící na buňky. Výzkumy prokázaly centrální roli dvou drah v navozování a udržování tohoto stavu. Jsou jimi p53/p21 a p16/RB. Rozsah jejich aktivace v odpovědi na různé stimuly je odlišný. Mírně odlišná je i jejich funkce v rámci navozování a udržování senescence. V této práci jsou právě tyto rozdíly nastíněny a porovnány.

**Klíčová slova:** senescence, DDR, p53, p21, p16, RB, HIRA, SAHF

## **Abstract**

Cellular senescence is a state of permanent growth arrest. It is induced by many stimuli, including telomere shortening, DNA damage, oncogene hyperstimulation, chromatin perturbation and various stresses by which are cells affected. Researches showed central role of two pathways in induction and maintenance of this state. These are the p53/21 and p16/RB. The extent and dynamics of their activation by various stimuli is different. Slightly different is also their function in induction and maintenance of senescence. These differences are depicted and compared in this work.

**Keywords:** senescence, DDR, p53, p21, p16, RB, HIRA, SAHF

# Úvod

Proliferující buňky procházejí buněčným cyklem, na jehož konci se při standardním průběhu rozdělí. Během existence buňky však může dojít k některým patologickým událostem, které průchod cyklem zastaví. Takovou událostí může být i poškození DNA. Existuje několik možností, jak se buňka s tímto poškozením vypořádá. Soudí se, že pokud je poškození relativně malé, dojde jen k přechodné zástavě buněčného cyklu, opravě poškození a následnému návratu zpět do cyklu. Pokud je poškození příliš velké, dochází k programované buněčné smrti – apoptóze, či trvalé zástavě buněčného cyklu a vstupu do stavu zvaného senescence.

Senescence je stav buňky charakterizovaný některými specifickými projevy, jako jsou trvalá zástava buněčného cyklu, změny genové exprese a morfologie buněk, rezistence k apoptóze a další. Poprvé byla popsána Leonardem Hayflickem, který pozoroval omezenou schopnost normálních proliferujících buněk neomezeně se dělit v kultuře i při zajištění všech podmínek nutných pro růst a dělení. Stav do kterého se takto buňky dostaly, byl pojmenován replikativní senescence. Příčinou se zdá být zkracování telomer během každého dělení úzce související s neschopností DNA polymeráz replikovat DNA na chromosomálních koncích. Další výzkumy ukázaly, že senescentního stavu může být dosaženo mnoha dalšími způsoby. Mezi tradiční patří například indukce senescence na základě poškození DNA, hyperstimulace onkogeny, některé změny v chromatinu a různé typy stresů.

Signalizace od prvotního stimulu až po senescentní stav není vždy úplně popsána, avšak vyvstávají zde zřetelně dvě dráhy, na jejichž integritě je navození a udržení senescentního stavu závislé téměř ve všech známých případech. První z nich je dráha vedoucí přes transkripční regulátor p53 a jeho efektor, inhibitor buněčného cyklu, p21waf1 (p21). Druhou je dráha vedoucí přes další z inhibitorů buněčného cyklu p16ink4a (p16) a RB protein. V podstatě obě dráhy končí na RB skrze tyto dva inhibitory.

Snahou této práce je nastínit postavení signalizace poškození DNA, reprezentované dráhou DDR → p53 → p21, v navozování a udržování buněčné senescence a porovnat její funkci a mechanismy působení s ostatními hlavními drahami.

Tato práce je omezena pouze na lidské modely, jelikož konkrétní

mechanismy indukce a udržování senescence vykazují některé zásadní mezidruhové odlišnosti. Kupříkladu senescence indukovaná dysfunkcí telomer je u lidí zprostředkovávána jak p53, tak p16/RB dráhou, zatímco u myši, zdá se, je za indukci zodpovědná pouze dráha p53. Stejně tak se prokázaly odlišnosti i mezi různými buněčnými typy. Většina výzkumů je prováděna na některém z kmenů lidských diploidních fibroblastů. Nověji pak na epiteliálních buňkách, které vykazují zajímavé odlišnosti.

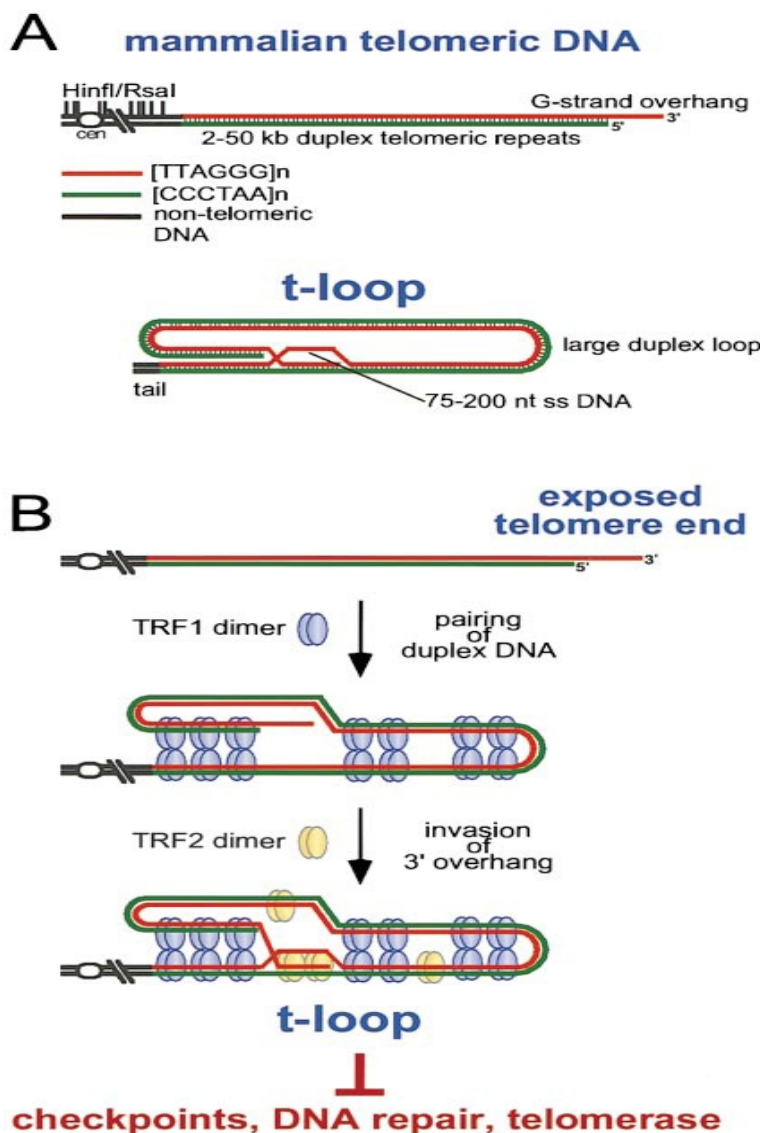
## **Charakteristiky senescentních buněk**

Senescentní buňky vykazují charakteristické znaky, které je odlišují od nesenescentních. Mezi tyto znaky řadíme trvalou zástavu buněčného cyklu (Di Leonardo et al., 1994), změny v morfologii, rezistenci vůči signálům spouštějícím apoptózu (Chen et al., 2000 ; Hampel et al., 2004), změněnou expresi některých proteinů, jako např. komponent cytoskeletu, inhibitorů buněčného cyklu, proteinů podílejících se na transportu z jádra do cytoplazmy, proteinů regulujících telomerázovou aktivitu a dalších (Tougas et al., 2006), a také možnost detekce specifických, se senescencí asociovaných markerů, jako třeba se senescencí asociovaná  $\beta$ -galaktosidáza SA- $\beta$ gal (Dimri et al., 1995).

## Rozdělení senescencí podle příčiny vzniku

### Telomery- dependentní

Telomery jsou koncové oblasti chromozomů zabezpečující jejich ochranu před fúzí s jinými chromozomy, čímž brání ztrátě genomové integrity. Jsou tvořeny repetitivními sekvencemi DNA a asociovanými proteiny jako jsou například „telomeric repeat-binding factor“ TRF1 a TRF2. Jejich délka značně varíruje mezidruhově, méně pak i mezi jednotlivými buněčnými typy v rámci jedince. U člověka je přibližně 10-15 kb. Ačkoli přesná struktura není známa, má se za to, že savčí telomery tvoří na konci složitou cirkulární strukturu zvanou t-loop. (Griffith *et al.*, 1999).



Obr. 1: Schematické znázornění telomerického t-loopu (převzato z Griffith *et al.*, 1999).



Při dělení buňky dochází k jejich zkracování z důvodů nedokonalosti DNA polymeráz, které nedokáží dosyntetizovat 3' konec chromozomu (respektive počátek nově vznikajícího řetězce na který samy nasedají). Vzniká tzv. „end replication problem“, který by mohl být důvodem zkracování telomer. Telomery by tak ztrácely 50 – 200 párů bazí při každé replikaci (Harley et al., 1990). Eroze telomer vede ke vzniku replikativní senescence (Stewart et al., 2003). Pozdější výzkumy ukázaly, že spíše než postupné zkracování má na vznik senescence vliv závažné poškození jednotlivých telomer, přičemž ostatní telomery nemusí dosahovat kritického zkrácení.

Zkracování lze obejít pomocí enzymu telomerázy, která přidává repetitivní telomerické sekvence na konce chromozomů. Telomeráza ke svému fungování vyžaduje buněčnou proliferaci (replikaci DNA). Sama o sobě senescentní buňky neimortalizuje (Beausejour; 2003). Výzkumy z poslední doby ukázaly další rozličné funkce telomerázy v rámci buněčného cyklu a naznačily tak mnohem komplexnější působení tohoto enzymu (Maida et al., 2009 ; Park et al., 2009 ; Ahmed et al., 2008).

Při poklesu délky pod určitou hraniční mez, nebo ztrátě, či dysfunkci asociovaných proteinů (zejm. TRF2 - telomere-repeat binding factor 2) dochází k signalizaci poškození skrze dráhu DNA -damage response (DDR) charakteristickou zejména pro reakci na poškození DNA ve formě dvouvláknových zlomů (double-strand break = DSB) (Herbig et al., 2004). Ke spuštění odpovědi stačí pravděpodobně jedna, nebo velmi málo nefunkčních telomer.

Při této odpovědi oblast telomer začíná asociovat s proteiny charakteristickými pro DDR, jako jsou například gama-H2AX (fosforylovaná verze histonu H2AX ), 53BP1 ( p53 binding protein), ATM (ataxia-telangiectasia mutated, kináza z rodiny fosfatidylinositol 3-kináz), Rad17 a Mre11. Tato místa jsou označována jako tzv. TIF (Telomere dysfunction-induced focus). Či přesněji – jsou to ohniska faktorů DDR, která koincidují se signály TRF1 (telomere-repeat binding factor 1) (Takai et al., 2003). Kináza ATM se jeví jako hlavní (nikoli však jediný) přenašeč signálu poškození telomer (Takai et al., 2003). CHK1 a CHK2 (checkpoint kinase 1 a 2), kinázy aktivované ATM, byly též fosforylovány a tudíž aktivní, nicméně jejich vazba na telomery nebyla pozorována (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Další pokusy prokázaly mohutnou aktivaci p53 u téměř senescentních buněk a s tím související nárůst hladiny inhibitoru buněčného cyklu p21, obojí silně korelovalo s výskytem gama-H2AX. Naopak u inhibitoru p16 tato korelace prokázána nebyla (Herbig et al., 2004).

## **Senescence indukovaná poškozením DNA**

K poškození genetické informace buňky může dojít mnoha způsoby. Jako důsledek některých endogenních procesů uvnitř buňky neustále vznikají volné kyslíkové radikály, které poškozují DNA. Buňka je dále vystavena mnoha škodlivým exogenním faktorům, jako jsou některé chemické mutageny, UV záření a ionizující radiace (IR).

Působením těchto a dalších faktorů může vzniknout mnoho různých typů poškození. Nejzávažnějším jsou dvouvláknové zlomy (DSB), které často způsobují přechod buněk do senescence, případně apoptózy.

Signalizace poškození je v tomto případě zprostředkována opět zejména klasickou DDR s následnou aktivací p53 a upregulací p21, což vede k zástavě cyklu v G1-fázi (Di Leonardo et al., 1994). Ačkoli je senescence HDF (human diploid fibroblast) velmi silně korelována s akumulací p 21, nejedná se o jediný faktor zodpovědný za zástavu, jelikož hladina p21 po dosažení senescence klesá. Naopak hladina inhibitoru p16 výrazně vzrůstá a zůstává vysoká delší čas (přibližně 2 měsíce) (Stein et al., 1999).

## **Onkogeny indukovaná senescence (OIS)**

Onkogeny jsou mutantní verze normálních genů, které mají v kombinaci se získanými mutacemi potenciál transformovat buňku. K onkogenímu efektu může dojít buď zvýšenou expresí klasických verzí těchto proteinů, nebo zvýšením jejich účinnosti.

Mezi onkogeny velmi často asociované s navozením buněčné senescence řadíme zejména specificky mutované proteiny RAS (rat sarcoma protein) (Serrano et al. 1997), ale existují i další– například RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma protein) (Zhu et al., 1998 ), BRAF (B-Raf, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) (Michaloglou et al., 2005), či MEK (MAP2K, Mitogen activated protein kinase) ( Lin et al., 1998) a další. Má se za to, že OIS slouží jako bariéra proti vzniku nádorového bujení in vivo (Braig et al., 2005 ; Bartkova et al., 2006).

Bylo prokázáno, že onkogenní stimulace vede k hyper-replikaci DNA . Následkem toho dochází k nekompletní replikaci, opakovanému spuštění

replikačních počátků, zvýšenému počtu aktivních replikonů a změněné progresi replikačních vidlic. To má za následek velmi silnou aktivaci DDR a navození OIS. (Di Micco et al., 2006). Již předtím bylo dokázáno, že RAS-stimulace primárních lidských buněk (fibroblastů) vedla k zástavě buněčného cyklu v G1-fázi doprovázeného akumulací p16 a p53 a fenotypicky nerozeznatelného od senescence (Serrano et al., 1997).

Inhibitor p16 se v tomto typu senescence jeví jako důležitější, jelikož buňky deficientní pro p16INK4a unikly senescenci zprostředkované RAS (Brookes et al., 2002).

Onkogenní RAS též aktivuje p38 mitogeny aktivovanou protein kinázu (p38MAPK). Ta se dokonce jeví jako esenciální pro RAS-indukovanou senescenci, jelikož v buňkách, kde došlo k inhibici aktivity p-38, RAS senescenci neindukoval (Wang et al., 2002).

## **Senescence vyvolaná poruchami chromatinu**

Některé změny v chromatinu mohou mít za následek spuštění mechanismů navozujících senescenci.

Za reorganizaci chromatinu jsou velmi často zodpovědné modifikace histonů, přičemž charakter příslušné modifikace určuje, zda bude mít inhibiční (formace heterochromatinu) či aktivační (formace euchromatinu) efekt na transkripci daných lokusů.

Se vznikem senescentního fenotypu bývá obvykle spojena formace heterochromatinu, konkrétně specifických útvarů zvaných SAHF (senescence-associated heterochromatin foci), které v sobě obsahují některé geny důležité pro průchod buněčným cyklem, např. cílové geny transkripčního aktivátoru E2F (E2 transcription factor) (Narita et al., 2003).

Prokázalo se i přímé navození senescentního fenotypu pouze na základě snížení histon-acetyltransferázy (HAT) P300, či syntézy její dominantně negativní alely. V buňkách lidského melanomu, kdy na základě tohoto došlo skrze nedostatečně acetylovaný histon H4 ke kondenzaci chromatinu v oblasti promotoru cyklinu E, z toho plynoucí represi transkripce a následnému vzniku charakteristických senescentních znaků (Bandyopadhyay et al., 2002)

Naproti tomu byla senescence způsobena i událostmi vedoucími k tvorbě euchromatinu. Inhibovaná histondeacetyláza indukovala fenotyp značně podobný

senescenci. Jako dominantní mediátor se zde ukázal být p16. Inhibitor p21 vykázal jen velmi slabý efekt (Munro et al., 2004).

## **Senescence navozená jinými faktory**

Mezi tento typ senescence počítáme zejména různé, více či méně definované stresy působící na buňku (vystavení nepříznivým růstovým podmínkám, přítomnost některých cytokinů apod.).

Například interferon beta indukuje RB dráhu zamezením fosforylace RB díky nízké aktivitě CDK6 (cyclin-dependent kinase 6) a vysokým hladinám p27 (CDKN1B, cyclin dependent kinase inhibitor 1B). Dále to vedlo k akumulaci HDM2 (human MDM2) a indukci PIG3 (p53-inducible gene3) (cílové proteiny p53), nikoli však p21. Po delší době působení interferonu (12 dní) však došlo i k indukci p21.  $\beta$ -interferon tudíž aktivoval dráhu p53. Pro indukci této dráhy byla nutná aktivace ATM/CHK2, ke které docházelo současně s akumulací ohnisek gama-H2AX. DDR byla aktivována  $\beta$ -interferonem prostřednictvím zvýšení kyslíkových radikálů (ROS - reactive oxygen species). Konstitutivní exprese onkogenů ERK2 (MAPK1, mitogen-activated protein kinase 1) a RASV12 zvýšila efektivitu  $\beta$ -interferonem indukované senescence. (Moiseeva et al., 2006).

Též se prokázalo p16/RB zprostředkované navození předčasné senescence u buněk (epidermálních keratinocytů a buněk epitelu prsní žlázy) kultivovaných v chemicky definovaném médiu na plastových substrátech. Předčasnou senescenci se v tomto případě zabránilo kultivací buněk na vrstvě podpurných buněk. Též se prokázala předčasná zástava cyklu u fibroblastů, kdy v přesně definovaném chemickém médiu určeném pro kultivaci fibroblastů s velmi malým množstvím séra (0,25%) zastavily dělení mnohem dříve než fibroblasty kultivované v 10% séru (Ramirez et al., 2001).

## **Hlavní signální dráhy senescence**

### **Dráha p53/p21**

p53 (protein 53) je jeden z hlavních regulátorů buněčného cyklu a důležitý nádorový supresor.

Je to tzv. „key decision protein“. Konverguje na něm více drah, které ho ovlivňují skrze různé posttranslační modifikace. Ve vztahu k senescenci se hlavním aktivátorem p53 jeví klasická odpověď na poškození DNA a ARF lokus.

### **Aktivace dráhy p53**

#### **ARF**

Též p14ARF, je nádorově supresorový protein, který je produktem transkripce alternativního čtecího rámce (ARF) lokusu CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, též INK4a/ARF). Transkripce tohoto lokusu je aktivována v odpovědi na různé stresy, či stimulaci některými onkogeny, jako například E2F1 (Dimri et al., 2000).

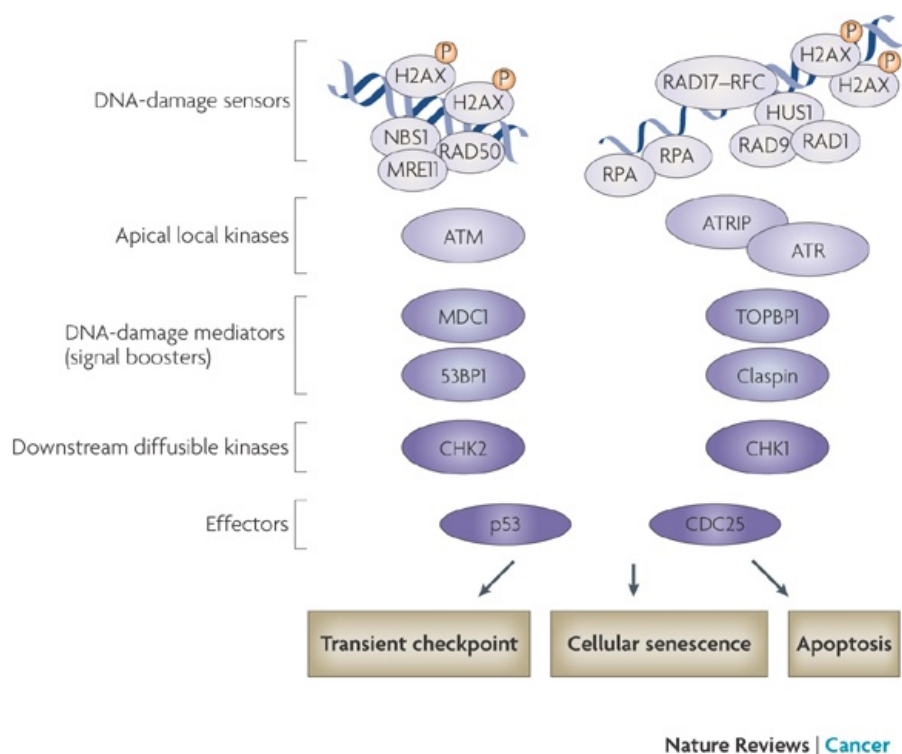
Jako hlavní mechanismus působení ARF na stabilizaci p53 se jeví přímá vazba ARF na E3 ubiquitin ligázu HDM2, která funguje jako negativní regulátor p53 (Kamijo et al., 1998 ; Stott et al., 1998). Prokázaly se ale i další mechanismy, kterými ARF působí na p53.

### **Odpověď na poškození DNA**

Odpověď na poškození DNA (DDR, DNA-damage response je poměrně konzervativní dráha zprostředkovávající odpověď na poškození DNA.

DDR je zodpovědná, či se aspoň z určité části účastní odpovědi na mnoho stimulů působících senescenci, jelikož tyto stimuly působí poškození DNA. Krom klasického spuštění DDR skrze indukci poškození pomocí různých látek či faktorů typu IR (ionizing radiation) se prokázala dominantní role v odpovědi na přílišné zkrácení či jiné poškození (reprezentované například ztrátou funkce klíčových proteinů) telomer (Herbig et al., 2004 ; d'Adda di Fagagna et al., 2003 ; Takai et al., 2003). Dále má zásadní roli v onkogenní hyperstimulaci, zejména tam, kde dochází k poškození DNA skrze hyperreplikaci, či zvýšení ROS indukovaného onkogeny (Di Micco et al., 2006 ; Lee 1999). Dlouhodobá stimulace některými cytokiny jako např.  $\beta$ -interferonem vede též k aktivaci DDR skrze zvýšení hladiny ROS (Moiseeva et al., 2006).

DDR poté předává signál na p53 (většinou skrze fosforylaci p53 pomocí kináz ATM a CHK2), který je zodpovědný za zástavu buněčného cyklu.



**Obr. 2:** Schematické znázornění proteinů účastnících se odpovědi na poškození DNA. (Převzato z d'Adda di Fagagna, 2008)

### p21 jako transkripční cíl a efektor p53

p21<sup>waf1</sup> (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) je inhibitor buněčného cyklu ze skupiny inhibitorů KIP/CIP (kinase inhibitory protein/(cyclin-dependent kinase)-Interacting Protein). Je transkribován na genu CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A). Zdá se, že minimálně ve vztahu k senescenci se jedná o hlavní efektor proteinu p53, který aktivuje jeho transkripci.

p21 interaguje s mnoha molekulami, ale za hlavní mechanismus jeho působení je obecně považována vazba na komplex cyklinE/cyklin-dependentní kináza 2 (CycE/Cdk2), ale v menší míře zřejmě může interagovat i s komplexy Cdk4/CycD a Cdk6/CycD (Stein et al., 1999). Tyto inhibované komplexy pak nemohou fosforylovat RB protein, který tak zůstává ve svém aktivním, hypofosforylovaném stavu a vazbou na transkripční aktivátor E2F brání transkripci genů esenciálních pro průchod buněčným cyklem.

p21 interaguje i s dalšími proteiny důležitými pro úspěšný průchod buněčným cyklem. Prokázala se kupříkladu přímá inhibice PCNA (proliferating cell nuclear antigen), který je esenciální pro replikaci DNA (Waga et al., 1994 ; Stein et al., 1999 ; Cayrol et al., 1998).

## **Dráha p16/RB**

p16/RB (protein 16/retinoblastoma protein) je dráha, jež začíná na inhibitoru buněčného cyklu p16 (též p16INK4a) z rodiny INK4 (inhibitor of cyclin-dependent kinase 4). Je kódován genem CDKN2A (též nazývaný INK4a/ARF lokus).

## **Role p16**

Mnoho stimulů způsobujících senescenci velmi silně koreluje se zvýšením hladiny p16. Jeho efekt se prokázal u replikační senescence, ačkoli s poměrně nesourodými výsledky, na které může mít vliv jednak použitý buněčný kmen, druhak vliv ostatních faktorů, jako jsou kultivační podmínky, a vliv určitých stresů, které ho též indukují . Prokázala se v tomto směru jak jeho relativně podružná role (Brookes et al., 2004), tak i velmi signifikantní (Jacobs et al., 2004). Dominantní role byla prokázána například při událostech vedoucích k defektním změnám chromatinu (Munro et al., 2004). Důležitější úloha mu připadá pravděpodobně i v některých senescencích indukovaných onkogeny (Brookes et al., 2002).

## **Aktivace**

Přesné mechanismy, které indukují expresi p16 stále ještě nejsou úplně odkryty. Ví se, že lokus INK4a, ze kterého je p16 přepisován, je inhibován proteiny z Polycomb rodiny jako např. Bmi1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) (Bracken et al., 2007). Snížení jejich exprese je velmi silně spojeno se zvýšením hladiny p16 a senescentním fenotypem (Itahana et al., 2003).

Dalším induktorem se ukázaly být transkripční faktory Ets1 a Ets2 (external transcribed spacer region 1 a 2), které aktivují promotor p16INK4a skrze konzervované Ets-vazebné místo. Ektopická exprese onkogenního RAS a následná

aktivace dráhy Ras-Raf-Mek zvýšila vazbu Ets1/Ets2 na promotor p16INK4a v mladých HDFs. Opačný efekt na transkripci p16INK4a se prokázal u proteinů z rodiny ID (inhibitor of DNA binding), které inhibují Ets (Ohtani et al., 2001).

Významný příspěvek k aktivaci p16INK4a vykazala též demetyláza JMJD3 (jumonji domain-containing protein 3), jejíž exprese byla silně indukována dráhou Ras-Raf. JMJD3 byla následně rekrutována k lokusu INK4a-ARF, kde přispívala k jeho transkripční aktivaci (Agger et al., 2009).

Redukovaná exprese c-myc vedla k iniciaci senescence skrze p16 a Bmi1. Bmi1 je přímým transkripčním cílem c-myc. Snížená exprese c-myc vedla ke snížené expresi Bmi1, což následně zvýšilo hladinu p16 a navodilo senescentní stav. Toto ukazuje, že p16 zaznamenává i hypoproliferativní nerovnováhy (Guney et al., 2006).

## **Realizace**

Obecně se má za to, že hlavní mechanismus, kterým p16 způsobuje senescenci je jeho vazba na komplexy cyklinu D s CDK4 a CDK6 (cyclin-dependent kinase 4 a 6). Tím je zabráněno fosforylaci proteinu RB, který ve svém hypofosforylovaném stavu váže a tím inhibuje transkripční faktor E2F, který je důležitý pro aktivaci transkripce genů důležitých pro průchod buněčným cyklem.

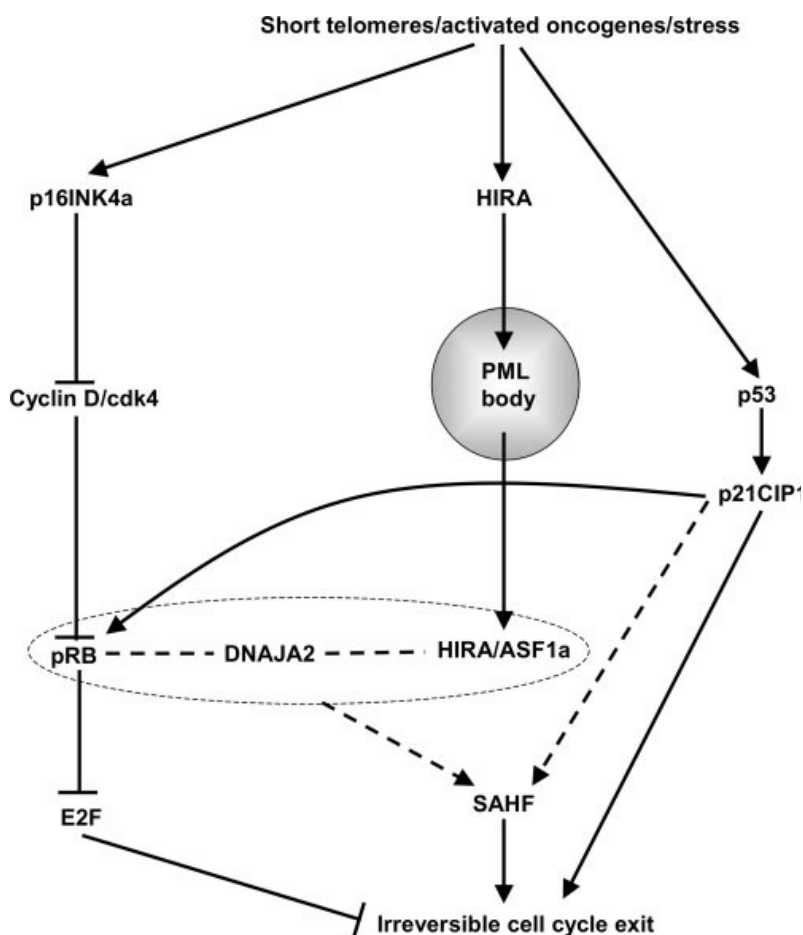
## **Wnt2/GSK3 $\beta$ /HIRA**

Wnt2 (wingless-type MMTV integration site family, member 2) je jeden z ligandů signální dráhy Wnt (wingless-type MMTV integration site family). Ukázalo se, že jeho represe, ke které dochází velmi brzy po nástupu senescence vede k relokizaci chaperonu HIRA (histone regulatory homolog A) do tělísek PML (promyelocytic leukemia protein). Toto přemístění přímo závisí na GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), efektoru dráhy WNT. GSK3 $\beta$  pravděpodobně fosforyluje HIRA na specifických místech (Ye et al., 2007a). Po vstupu do tělísek PML HIRA přechodně kolokalizuje s HP1 (heterochromatin protein 1, jeden ze základních proteinů podílejících se na formaci heterochromatinu), předtím, než je HP1 začleněn do SAHFs. Pro efektivní formaci SAHFs je důležitá fyzická interakce HIRA s dalším histonovým chaperonem ASF1 (anti-silencing function 1). Společně pak řídí formaci

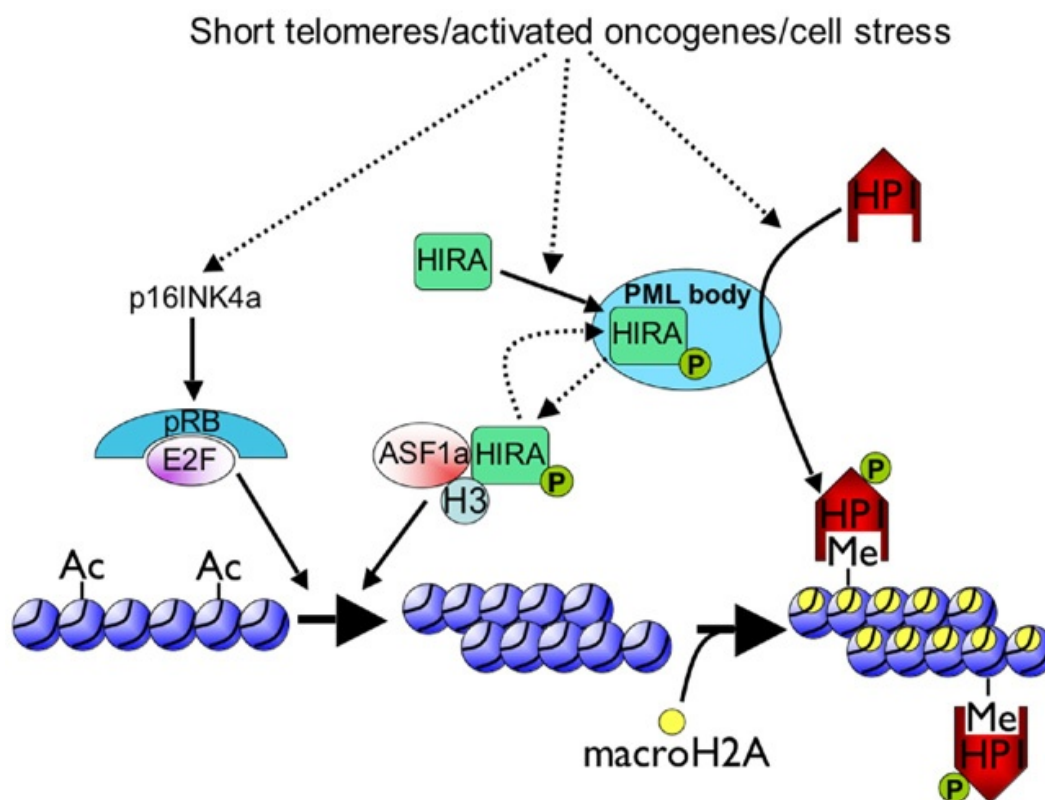


SAHFs obsahujících macro-H2A a se senescencí spjatý výstup z buněčného cyklu skrze dráhu, která závisí na toku heterochromatinových proteinů skrze PML (Zhang et al., 2005).

Translokace HIRA do PML se uskutečnila v odpovědi na široké spektrum stimulů, jako např. oxidační stres, krátké telomery a hyperstimulace onkogenem RAS. Je nezbytná pro formaci SAHFs a je nezávislá na p53 a RB, avšak samotná formace SAHFs vyžaduje integritu těchto drah. Pakliže má být efektivní, tak integritu obou. Naopak to platí též. K úspěšné formaci SAHFs je nutný krom RB i komplex HIRA/ASF1. Tato data podporují model, kde pRB a HIRA/ASF1 konvergují downstream od relokace HIRA do PML. Tato role je momentálně přisuzována DNA vazebnému proteinu DNAJA2 (DnaJ homolog, subfamily A, member 2) (Ye et al., 2007b). Tato dráha sama o sobě není schopná navodit senescenci. Je však nepostradatelná při formaci SAHFs a nejspíš tedy i při navození nevratného senescentního stavu.



Obr. 3: Navrhovaný model součinnosti drah p16/RB, p53/p21 a Wnt2/GSK3/HIRA při formaci SAHF (převzato z Ye et al., 2007b).



Obr. 4 : Model formace SAHF (Převzato z Adams, 2007)

## Porovnání funkce drah p16/RB a p53

Buněčná senescence nemusí být vždy ireversibilní. Ukázalo se, že stav je zvrtný v závislosti na expresi inhibitoru p16. Buňky, u kterých dojde k navození senescence p53- dependentním mechanismem, při současné nízké hladině p16, se mohou vrátit zpět do cyklu po inaktivaci p53. Buňky, u kterých je hladina p16 vyšší, vykazují i po inaktivaci p53 jen nízkou nebo žádnou schopnost vrátit se zpět do cyklu. Při déletrvajícím působení zvýšené hladiny inhibitoru p16 však dochází k senescentnímu stavu, který neumožňuje návrat do cyklu jakýmkoli přirozenými mechanismy (Beausejour et al., 2003). Toto pravděpodobně souvisí s formací represivního chromatinu, kterou dráha p16/RB aktivuje (Narita et al., 2003) a dále se na ní podílí společně s drahou vedoucí přes chaperon HIRA (Ye et al., 2007). Rozdílná je i kinetika drah p53/p21 a p16/RB. Zatímco ke zvýšení hladiny p21 dochází relativně rychle a po navození senescence hladina opět rychle klesá v řádu hodin až dnů, u inhibitoru p16 dochází k pozvolnějšímu vzestupu a následný pokles může trvat i v řádu měsíců (Stein et al., 1999).

## **Závěr**

Ke vzniku senescence může přispívat mnoho faktorů, projevujících se dále vícero různými mechanismy, které nakonec v drtivé většině případů konvergují na drahách p53/p21 a p16/RB, či obou zároveň. Velmi mnoho stimulů působí ve výsledku poškození DNA, které je signalizováno poměrně konzervativní dráhou odpovědi na poškození DNA s následnou aktivací p53/p21, která tak představuje pravděpodobně hlavní mechanismus navozování senescence, pojímající širší spektrum stimulů, přinejmenším u lidských fibroblastů. V udržování senescence má však podle všeho zásadnější úlohu dráha p16/RB společně s dráhou vedoucí přes chaperon HIRA. Na nich zejména, je závislá formace represivního chromatinu a s tím související ustavení skutečně ireversibilní senescence, i v případě následné inaktivace těchto drah.

Adams, P.D., Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene* **397**, 84-93 (2007).

Agger, K., Cloos, P.A., Rudkjaer, L., Williams, K., Andersen, G., Christensen, J., and Helin, K. (2009). The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev.* **23**, 1171–1176.

Ahmed, S. *et al.* Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J. Cell Sci.* **121**, 1046-1053 (2008).

Bandyopadhyay, D. *et al.* Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes. *Cancer Res.* **62**, 6231–6239 (2002).

Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).

Beausejour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222 (2003).

Bracken, A. P. *et al.* The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A–ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev.* **21**, 525–530 (2007).

Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660–665 (2005).

Brookes, S., Rowe, J., Ruas, M., Llanos, S., Clark, P. A., Lomax, M., James, M. C., Vatcheva, R., Bates, S., Vousden, K. H., Parry, D., Gruis, N., Smit, N., Bergman, W., Peters, G. INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Embo J.* **21** 2936-45 (2002).

Brookes, S., Rowe, J., Gutierrez Del Arroyo, A., Bond, J., & Peters, G. (2004). Contribution of p16(INK4a) to replicative senescence of human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, **298**, 549–559.

Cayrol, C., Knibiehler, M., Ducommun, B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* **16**, 311-320 (1998).

Chen, Q. M., Liu, J. & Merrett, J. B. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts. *Biochem. J.* **347**, 543–551 (2000).

d'Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere initiated senescence. *Nature* **426**, 194–198 (2003).

d'Adda di Fagagna, F., Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 512-522 (2008).

Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**, 2540–2551 (1994).

Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyperreplication. *Nature* **444**, 638–642 (2006).

Dimri, G. P. *et al.* A novel biomarker identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 9363–9367 (1995).

Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M., Campisi, J. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol.* **20**, 273-285 (2000).

Griffith, J. D. *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503–514 (1999).

Guney, I., Wu, S., Sedivy, J. M. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3645-3650 (2006).

Hampel, B., Malisan, F., Niederegger, H., Testi, R. & Jansen-Durr, P. Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Exp. Gerontol.* **39**, 1713–1721 (2004).

Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460 (1990).

Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J. & Sedivy, J. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* **14**, 501–513 (2004).

Itahana, K. *et al.* Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 389–401 (2003).

Jacobs, J. J. & de Lange, T. Significant role for p16(INK4a) in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol.* **14**, 2302–2308 (2004).

Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., Sherr, C.J. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 8292–8297 (1998).

Lee, A. C., Fenster, B. E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N. S., Hirai, T., *et al.* Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 7936–7940 (1999).

Lin, A. W. *et al.* Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* **12**, 3008–3019 (1998).

Maida, Y. *et al.* An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature* **461**, 230–235 (2009).

Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescencelike cell cycle arrest of human nevi. *Nature* **436**, 720–724 (2005).

- Moiseeva, O., Mallette, F. A., Mukhopadhyay, U. K., Moores, A. & Ferbeyre, G. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged  $\beta$ -interferon stimulation. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1583–1592 (2006).
- Munro, J., Barr, N. I., Ireland, H., Morrison, V. & Parkinson, E. K. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp. Cell Res.* **295**, 525–538 (2004).
- Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703–716 (2003).
- Ohtani, N. *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16/INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067–1070 (2001).
- Park, J. I. *et al.* Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* **460**, 66–72 (2009).
- Ramirez, R. D. *et al.* Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* **15**, 398–403 (2001).
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997).
- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A. & Dulic, V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2109–2117 (1999).
- Stewart, S. A., Ben-Porath, I., Carey, V. J., O'Connor, B. F., Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. (2003). Erosion of the telomeric singlestrand overhang at replicative senescence. *Nature Genetics*, **33**, 492–496.
- Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H., Peters, G. The alternative product

from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* **17**, 5001-5014 (1998).

Takai, H., Smogorzewska, A. & de Lange, T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* **13**, 1549–1556 (2003).

Trougakos, I. P., Saridaki, A., Panayotou, G. & Gonos, E. S. Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 88–92 (2006).

Waga, S., Gregory, J., Hannon, J., Beach, D., Stillman, B. The p21 inhibitor of cyclin dependent kinases controls DNA replication by Interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-578 (1994).

Wang, W., Chen, J. X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J. J., Huang, S., Sun, P. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol.* **22**, 3389-3403 (2002).

Ye, X., Zerlanko, B., Kennedy, A., Banumathy, G., Zhang, R., and Adams, P.D. (2007a). Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Mol. Cell* **27**, 183–196.

Ye, X., Zerlanko, B., Zhang, R., Somaiah, N., Lipinski, M., Salomoni, P., and Adams, P.D. (2007b). Definition of pRB- and p53-dependent and -independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2452–2465.

Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* **8**, 19–30.

Zhu, J., Woods, D., McMahon, M. & Bishop, J. M. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic raf. *Genes Dev.* **12**, 2997–3007 (1998).